



Н.А. Дементьєва¹, С.В. Антонюк², В.В. Соцко²

Гістологічне та імуногістохімічне дослідження в диференційній діагностиці судинних аномалій у дітей молодшого віку

¹ КЗ «Дніпропетровська обласна дитяча клінічна лікарня» ДОР

² ДЗ «Дніпропетровське обласне патологоанатомічне бюро»

Мета роботи — вивчити можливість диференційної діагностики судинних аномалій у дітей шляхом гістологічного й імуногістохімічного досліджень експресії маркерів Ki-67 і GLUT-1 у біоптатах видалених тканин.

Матеріали та методи. Проведено гістологічне та імуногістохімічне дослідження з визначенням експресії маркера проліферації білка Ki-67 і білка-транспортера глюкози GLUT-1 у тканинах судинних утворень різних локалізацій, видалених шляхом висічення в межах здорових тканин в умовах загального знеболювання у 34 дітей віком від 1 міс до 3 років.

Результати та обговорення. У фазі проліферації індекс проліферативної активності ендотеліальних клітин склав $(9,8 \pm 0,9) \%$, у вогнищах інволюції — $(2,3 \pm 0,4) \%$ та $(0,6 \pm 0,01) \%$ — у судинних мальформаціях. Позитивна мембранна й часткова цитоплазматична реакція білка-транспортера глюкози GLUT-1 відзначалася у всіх гемангіомах незалежно від фази розвитку та була негативною в ендотеліальних клітинах мальформацій.

Висновки. Патоморфологічна картина мальформацій істотно відрізняється від такої в гемангіом. Під час проведення морфологічної діагностики патологічних утворень судинного генезу в дітей у складних випадках реакція на білок GLUT-1 може слугувати диференціальною імуногістохімічною ознакою відмінності дитячих гемангіом і мальформацій, а в комплексі з Ki-67 — фаз розвитку гемангіом.

Ключові слова: судинні аномалії, діти, імуногістохімічне дослідження.

Судинні аномалії в дітей — неоднорідна група спатологічних процесів, серед яких переважають так звані інфантні гемангіоми. Поширеність становить 1—3 % новонароджених і 10—12% дітей у кінці першого року життя [1, 6—8, 11, 13].

Термін «гемангіома» від моменту виникнення в 1853 р. (R. Virchow) тривалий час використовувався для позначення різних типів доброякісних судинних пухлин і мальформацій, що призводило до великої плутанини, неправильної діагностики та лікування судинних уражень, а також задавало неправильні напрямки дослідницьким зусиллям. Із середини 70-х років ХХ ст. більшість авторів почали відрізняти ангіодисплазії від гемангіом, котрі є доброякісними пухлинами та утворюються за рахунок проліферації ендотелію. У 1982 р. J.V. Mulliken і J. Glowacki за допомогою гістохімічного, ауторадіографічного та електронно-мікроскопічного методів дослідження біоптатів від пацієнтів із судинними ураженнями показали відмінності у клінічному перебігу захворювання залежно від морфологічної картини, довели існування гемангіом (пухлин) і судинних мальформа-

цій як принципово різних патологічних станів [11] та запропонували функціональну класифікацію. Модифікація цієї класифікації була прийнята Міжнародним товариством з вивчення судинних аномалій (International Society for the Study of Vascular Anomalies, ISSVA) у 1996 р. Відповідно до цієї модифікованої класифікації судинні аномалії поділяють на дві великі групи: проліферативні і статичні (непроліферативні) [11].

Сьогодні низка фахівців вважає за необхідне виокремлювати інфантні (дитячі) гемангіоми з розряду пухлин і поділяти, таким чином, усі судинні новоутворення на три основні групи: судинні гіперплазії, судинні мальформації та справжні пухлини [1, 3, 4]. Прагнення виокремити судинні гіперплазії в самостійну групу пов'язане з унікальною особливістю цих утворень — здатністю до спонтанної інволюції.

На жаль, досі багато з практичних лікарів використовують термін «гемангіома» як збірний, не диференціюючи різні види судинних уражень.

Це призводить до тактичних помилок. З одного боку, існує помилкова думка про те, що всі судинні аномалії зникають із плином часу (але цей постулат стосується тільки дитячих гемангіом). З другого боку, з появою безлічі лікувальних можливостей піддають різним впливам ті судинні утворення, які лікувати не потрібно або які вимагають іншого виду впливу, а не призначеного.

Стаття надійшла до редакції 25 листопада 2013 р.

Дементьєва Наталія Анатоліївна, головний лікар, головний позаштатний дитячий онколог
49100, м. Дніпропетровськ, вул. Космічна, 13
Тел. (056) 713-71-00. E-mail: dementievana@ukr.net

Розрізнення гемангіом і судинних мальформацій надзвичайно важливе для планування адекватних дій [1, 7, 14].

У переважній більшості випадків достатньо вивчення анамнезу, аналізу клінічних виявів, іноді доповнених неінвазивними дослідженнями (ультразвуковим, деколи комп'ютерною або магнітно-резонансною томографією) [3, 4, 6–8].

Однак у тих рідкісних ситуаціях, коли на підставі клінічних даних встановити природу об'ємного судинного процесу не вдається (частіше через особливості локалізації, наприклад, при локусах у печінці), застосовують морфологічний метод. Використовується він також як науковий складник для визначення характеру змін у матеріалах, віддалених при хірургічному лікуванні.

Якщо до 1980-х років патоморфологічні дослідження базувалися винятково на оптичній та електронній мікроскопії, то в останні десятиліття широко застосовуються імуногістохімічні методи дослідження, які дають змогу вивчити метаболічні процеси на тканинному, клітинному й молекулярному рівнях [1, 9–12].

Мета роботи — вивчити можливість диференціальної діагностики гемангіом і судинних мальформацій у дітей з локальними судинними аномаліями шляхом проведення гістологічного й імуногістохімічного дослідження з використанням маркерів Ki-67 і GLUT-1 у біоптатах видалених тканин.

Матеріали та методи

Досліджено тканини обмежених судинних утворень різних локалізацій, видалених шляхом висічення в межах здорових тканин в умовах загального знеболювання у 35 дітей із 38 локусами ураження віком від 1,5 тижня до 22 міс (15 хлопчиків, 20 дівчинок) у КЗ «Дніпропетровська обласна дитяча клінічна лікарня» ДОР. Морфологічне дослідження видалених тканин виконано на базі КЗ «Дніпропетровське обласне патологоанатомічне бюро».

Здійснено гістологічне та імуногістохімічне дослідження з визначенням експресії таких маркерів: маркера проліферації білка Ki-67 і білка-транспортера глюкози GLUT-1.

Для гістологічного дослідження шматочки тканин фіксували в 10 % забуференому розчині фор-

маліну. Зневоднення виконували за стандартними методиками за допомогою спиртів висхідної концентрації та вміщували в парафін. Гістологічні зрізи завтовшки 5 мкм фарбували гематоксиліном та еозином. Морфологічну картину оцінювали за допомогою мікроскопа «Leica DM 2500».

Імуногістохімічні реакції проводили згідно зі стандартними протоколами [2, 5]. Парафінові зрізи завтовшки 4 мкм виготовляли за допомогою мікротома «Microm HM 315 (Thermoscientific)» та наклеювали на адгезивні («Superfrost® Plus») предметні скельця. Використовували моноклональні мишачі та кролячі антитіла (табл. 1). Після депарафінізації і промивання в дистильованій воді проводили демаскування антигенів у 0,01 М цитратному буфері (рН 6,0) за допомогою мікрохвильової печі. Блокування ендогенної пероксидази здійснювали у 3 % розчині H_2O_2 протягом 10 хв. Інкубацію первинних антитіл у рекомендованих виробником розведеннях здійснювали впродовж години за кімнатної температури у вологій камері. Візуалізацію здійснювали системою «UltraVision Quanto Detection System (Thermoscientific)», де у функції ферментної мітки використовується пероксидаза хрому, а хромогеном є діамінобензидин («DAB Plus Chromogen»).

Проліферативну активність ендотеліальних клітин гемангіом і мальформацій визначали за допомогою моноклональних кролячих антитіл Ki-67 (табл. 1). Позитивними клітинами вважалися клітини з ядерною реакцією різного ступеня інтенсивності. З метою проведення диференційної діагностики між гемангіомами та мальформаціями використовували поліклональні кролячі антитіла до білка GLUT-1 з мембранною та частковою цитоплазматичною реакцією ендотеліальних клітин (табл. 1).

Результати та обговорення

Під час гістологічного дослідження встановлено, що гемангіоми розташовувалися в дермі, мали часточкову будову й мізерну строму. У частині випадків вони поширювалися на підшкірну жирову клітковину.

У фазі проліферації часточки були представлені капілярами з вузькими щілинами, вистеленими гіперплазованим набряклим соковитим ендотелієм

Таблиця 1

Моноклональні антитіла, використані в імуногістохімічному дослідженні

Антиген	Виробник	Клон	Тип реакції	Розведення
GLUT-1	Thermoscientific	—	Мембранна, вогнищева цитоплазматична	1 : 1000
Ki-67	Diagnostic Biosystems	SP6	Ядерна	1 : 600

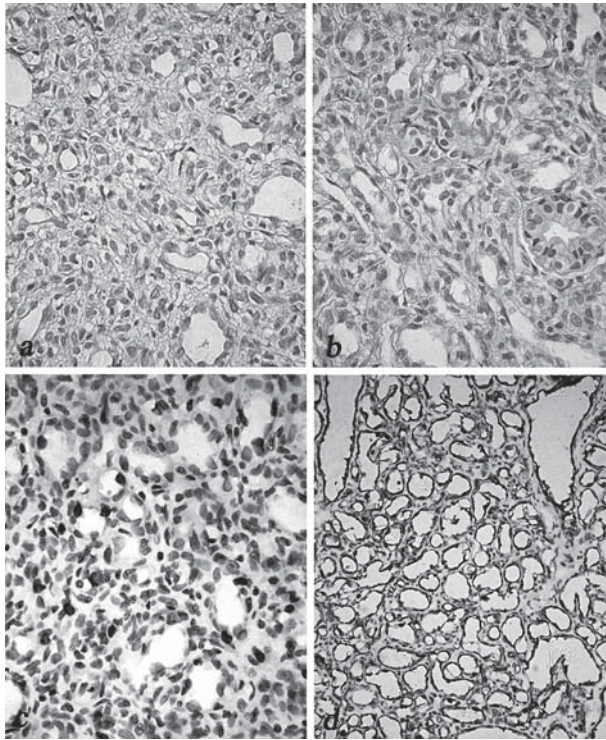


Рис. 1. Морфологічна характеристика гемангіом у фазі проліферації: а, б — виражена проліферація судин капілярного типу з вузькими щілинами та соковитим ендотелієм, х 200; с — високий рівень проліферативної активності ендотеліальних клітин, Ki-67, х 400; д — виражена мембранна та вогнищева цитоплазматична експресія білка-транспортера глюкози GLUT-1, х 200. а, б — фарбування гематоксиліном та еозином; с, д — імунопероксидазний метод

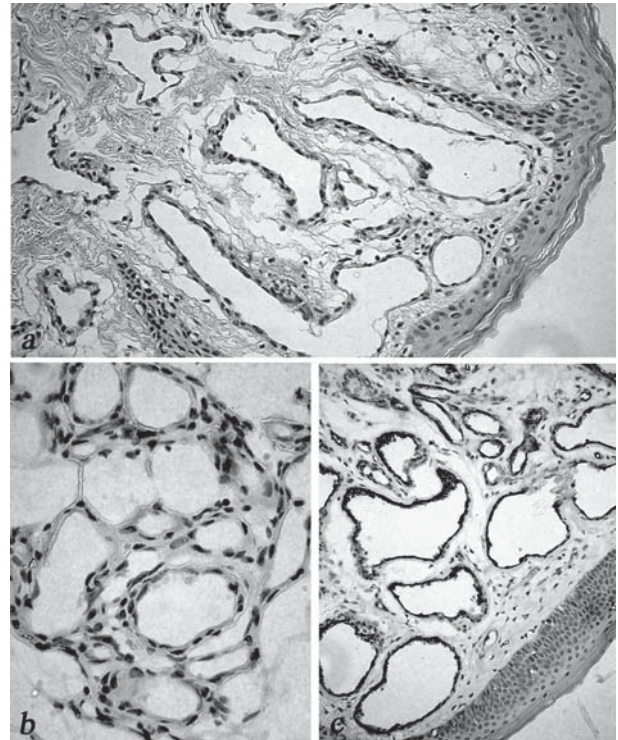


Рис. 2. Морфологічна характеристика гемангіом у фазі інволюції: а — різке розширення просвіту судин, розташованих серед фіброзної стромы, ендотелій сплющений з мізерною цитоплазмою, х 200; б — низький рівень проліферативної активності ендотеліальних клітин, Ki-67, х 400; с — позитивна мембранна реакція GLUT-1 ендотеліоцитів, х 200. а — фарбування гематоксиліном та еозином; б, с — імунопероксидазний метод

з еозинофільною цитоплазмою та гіперхромними ядрами (рис. 1а, 1б). В окремих ділянках просвіти ледве проглядалися через щільне розташування клітин. Індекс проліферативної активності ендотеліальних клітин склав ($9,8 \pm 0,9$) % (табл. 2).

Під час переходу гемангіом із проліферативної фази у фазу інволюції на тлі гіперплазованих полів з'являлися капіляри з розширеним просвітом і сплющеним ендотелієм (рис. 2а). Вони розташовувалися серед фіброзної стромы, мали неправильну форму і втрачали часточкову будову. Ендотеліальні клітини набували сплющеної форми, їх цитоплазма була мізерною, блідою, ядро витягнуте. Найбільш виражені інволютивні зміни відзначалися в субепідермальних відділах шкіри. У глибших відділах дерми вони зберігали ознаки проліферативної фази, однак знижувалася клітинність, відзначався вогнищевий фіброз і поява капілярів із розширеними просвітами та сплющеним ендотелієм з мізерною блідою цитоплазмою. У міру розвитку фіброзу втрачалася часточко-

вість, зменшувалася кількість капілярів. Слід зазначити, що в більшій частині гемангіом одночасно спостерігалися ознаки проліферації та інволюції, переважання яких перебувало у прямій залежності від давнини процесу й визначало клінічну картину. Нам не вдалося за морфологічними ознаками однозначно вирізнити гемангіоми у фазі «плато», яка досить чітко визначалася клінічно. На наш погляд, це не статична ситуація, а вияв динамічної рівноваги процесів проліферації та інволюції.

Таблиця 2
Порівняльна характеристика проліферативної активності гемангіом і мальформацій ($M \pm m$)

Показник	Гемангіома		Мальформація (n = 9)
	Фаза проліферації (n = 11)	Фаза інволюції (n = 18)	
Ki-67, %	$9,81 \pm 0,59$	$2,02 \pm 0,07$	$0,57 \pm 0,08$
GLUT-1	+	+	—

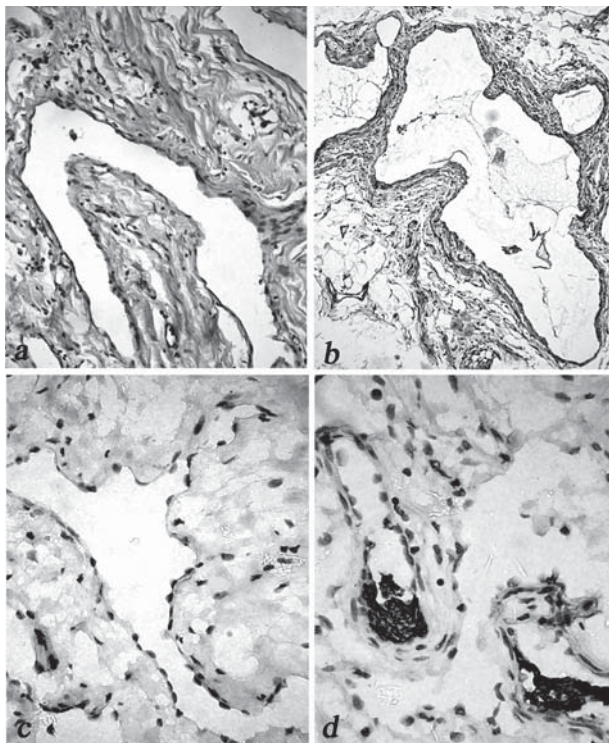


Рис. 3. Морфологічна характеристика мальформацій: а, б — різко розширені судини з товстими склерозованими стінками та сплющеним ендотелієм, х 200; с — відсутність проліферації ендотеліоцитів, Ki-67, х 200; д — негативна реакція ендотеліальних клітин і позитивна експресія в еритроцитах білка GLUT-1, х 200. а, б — фарбування гематоксиліном та еозином; с, д — імунопероксидазний метод

Імуногістохімічне дослідження проліферативної активності ендотеліальних клітин у різних фазах розвитку гемангіом виявило істотні відмінності. Позитивна ядерна реакція Ki-67 в ендотеліальних клітинах фази проліферації склала ($9,8 \pm 0,9$ %), у той час як у вогнищах інволюції вона була значно нижчою — ($2,3 \pm 0,4$ %) (рис. 1с, 2б). Позитивна мембранна й часткова цитоплазматична реакція білка-транспортера глюкози GLUT-1 відзначалася у всіх гемангіомах незалежно від фази розвитку (рис. 1д, 2с).

Гістологічна картина мальформацій істотно відрізнялася від гемангіом і характеризувалася наявністю розширених кровоносних судин різних розмірів і форми з переважно товстими склерозованими стінками (рис. 3а, 3б). Внутрішня поверхня судинної стінки була вистелена сплющеним ендотелієм із витягнутим ядром і мізерною світлою цитоплазмою. У просвіті судин визначалися скупчення еритроцитів і поодинокі еритроцитарні тромби.

Під час імуногістохімічного дослідження проліферативна активність ендотеліальних клітин була низькою. Ядерна експресія Ki-67 визначала-

ся лише в поодиноких ендотеліоцитах і склала лише ($0,6 \pm 0,01$ %) (табл. 2, рис. 3с). На відміну від гемангіом реакція на білок GLUT-1 була негативною за позитивної реакції в еритроцитах (рис. 3д).

У результаті проведеного дослідження виявлено ознаки ранньої інволюції (до 6 міс життя) гемангіом у 4 (13,8%) дітей, зягнуту проліферацію (у віці 1 рік) в 1 (3,4 %) дитини. Інші 24 гемангіоми мали класичний перебіг. В 1 дитини у віці 4 міс за клінічними ознаками передбачалася наявність судинної мальформації, яка виявилася гемангіомою з ранніми виявами інволюції, та в 1 дитини віком 12 міс ураження, яке трактувалося як гемангіома, виявилася мальформацією. Висновки по решті 36 утвореннях збіглися із клінічними сподіваннями.

Наші результати підтверджують дані інших дослідників [9–12] про те, що наявність GLUT-1 у мальюкових гемангіомах — це універсальна і специфічна характеристика, незалежна від мітотичної активності, фази та анатомічного розташування локусу ураження. Проте Ki-67 слугує неспецифічним маркером, який змінюється відповідно до змін проліферативної активності тканин.

Висновки

1. Патоморфологічна картина мальформацій істотно відрізняється від такої в гемангіом.
2. Під час проведення морфологічної діагностики патологічних новоутворень судинного генезу в дітей у складних випадках реакція на білок GLUT-1 може слугувати диференціальною імуногістохімічною ознакою відмінності дитячих гемангіом і мальформацій, а в комплексі з Ki-67 — фаз розвитку гемангіом.

Перспективи подальших досліджень. Розуміння механізмів природного розвитку дитячих гемангіом може сприяти розробці нових терапевтичних опцій, зокрема лікарської терапії, яка сьогодні стає головною в їх лікуванні й має на меті зупинити прогресування проліферації та/або прискорити інволюцію. Водночас механізми трансформації гемангіом, як природної, так і індукованої фармакологічним впливом, досить мало з'ясовані. Сам факт спонтанної інволюції пухлини важко піддається поясненню. Чому та як змінюється співвідношення ростових факторів у тканинах, чому вони втрачають біологічно активні речовини, що відбувається із внутрішньо- та зовнішньоклітинними ензимними системами та міжклітинним матриксом, завдяки яким механізмам відбувається облітерація судин, гинуть і розсмоктуються ендотеліоцити з повним відновленням ушкодженої шкіри — теми подальших наукових розробок.

Література

1. Надточий А.Г., Рогинский В.В., Григорьян А.С., Ковязин А.В. Размышления о биологической сущности инфантильных гемангиом // Ультразвуковая и функциональная диагностика. — 2011. — № 6. — С. 72—82.
2. Петров С.В., Райхлин Н.Т. Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей человека. — Казань, 2004. — 452 с.
3. Рогинский В.В., Надточий А.Г., Григорьян А.С. и др. Диагностика образований из кровеносных сосудов челюстно-лицевой области и шеи у детей // Стоматология детского возраста и профилактика. — 2010. — № 1. — С. 56—61.
4. Рогинский В.В., Надточий А.Г., Григорьян А.С. и др. Классификация образований из кровеносных сосудов челюстно-лицевой области и шеи у детей // Стоматология. — 2011. — № 4. — С. 71—74.
5. Key M. Immunohistochemical Staining Methods. — Ojai, CA, USA: Bimedical Services, 2006. — 174 p.
6. Chang L.C., Haggstrom A.N., Drolet Beth A. et al. Growth characteristics of infantile hemangiomas: implications for management // Pediatrics. — 2010. — N 126 (6). — P. 1589—1593.
7. Cremer H.J. Hämangiome: klassifizierung und therapieempfehlungen // Pädiatrie hautnah. — 2009. — N 21 (2). — P. 133—146.
8. Cremer H.J. Hämangiome (Vaskuläre Tumoren) // Neurologische Therapie im Kindesalter. — Auflage, 2009. — P. 253—261.
9. Handra-Luca A., Montgomery E. Vascular malformations and hemangiolymphangiomas of the gastrointestinal tract: morphological features and clinical impact // Int. J. Clin. Exp. Pathol. — 2011. — 4 (5). — P. 430—443.
10. Mo J.Q., Dimashkieh H.H., Bove K.E. GLUT1 endothelial reactivity distinguishes hepatic infantile hemangioma from congenital hepatic vascular malformation with associated capillary proliferation // Hum. Pathol. — 2004. — 35 (2). — P. 200—209.
11. Mulliken J.B., Young A.E. Vascular birthmarks // Hemangiomas and malformations. — W.B. Saunders and Co., 1988. — P. 39—65.
12. North P.E., Waner M., Mizeracki A., Mihm M.C. Jr. GLUT1: a newly discovered immunohistochemical marker for juvenile hemangiomas // Hum. Pathol. — 2000. — N 31 (1). — P. 11—22.
13. Storch C.H., Hoeger P.H. Propranolol for infantile haemangiomas: insights into the molecular mechanisms of action // Br. J. Dermatol. — 2010. — 163. — P. 269—274.
14. Zvulnov A., Metzker A. Hemangiomas and vascular malformations: unapproved treatment // Clin. Dermatol. — 2002. — 20. — P. 660—667.

Н.А. Дементьева¹, С.В. Антонюк², В.В. Соцко²

Гистологическое и иммуногистохимическое исследование в дифференциальной диагностике сосудистых аномалий у детей младшего возраста

¹ КЗ «Днепропетровская областная детская клиническая больница» ДОС
² ГУ «Днепропетровское областное патологоанатомическое бюро»

Цель работы — изучить возможность дифференциальной диагностики сосудистых аномалий у детей путем гистологического и иммуногистохимического исследований экспрессии маркеров Ki-67 и GLUT-1 в биоптатах удаленных тканей.

Материалы и методы. Проведено гистологическое и иммуногистохимическое исследование с определением экспрессии маркера пролиферации белка Ki-67 и белка-транспортера глюкозы GLUT-1 в ткани сосудистых образований различных локализаций, удаленных путем иссечения в пределах здоровых тканей в условиях общего обезболивания у 34 детей в возрасте 1 мес — 3 года.

Результаты и обсуждение. В фазе пролиферации индекс пролиферативной активности эндотелиальных клеток составил $(9,8 \pm 0,9) \%$, в очагах инволюции — $(2,3 \pm 0,4) \%$ и $(0,6 \pm 0,01) \%$ — в сосудистых мальформациях. Положительная мембранная и частичная цитоплазматическая реакция белка-транспортера глюкозы GLUT-1 отмечалась во всех гемангиомах независимо от фазы развития и была отрицательной в эндотелиальных клетках мальформаций.

Выводы. Морфологическая картина мальформаций и гемангиом различна. При проведении морфологической диагностики новообразований из кровеносных сосудов у детей реакция на белок GLUT-1 может служить дифференциальным иммуногистохимическим признаком отличия детских гемангиом и мальформаций, а в комплексе с Ki-67 — фаз развития гемангиом.

Ключевые слова: сосудистые аномалии, дети, иммуногистохимическое исследование.

N.A. Dementieva¹, S.V. Antoniuk², V.V. Sotsko²

Histological and immunohistochemical study in the differential diagnosis of vascular anomalies in infants

¹ Regional Children Hospital of Dnipropetrovsk DRS, Ukraine

² Dnipropetrovsk Autopsy Regional Office, Ukraine

Objective. To study the possibility of differentiate diagnosis of the vascular anomalies in children by means of the histological and immunohistochemical investigations of the expression of markers Ki-67 and GLUT-1 in the bioptates of the isolated tissues.

Materials and methods. The histological and immunohistochemical investigations have been performed to determine the expression of the proliferation marker protein Ki-67 and protein which transporting glucose GLUT-1 in tissues of vascular lesions of various sites that were isolated by excision within healthy tissues under conditions of general anesthesia in 34 children aged from 1 month to 3 years.

Results and discussion. Index of proliferative activity of endothelial cells was 9.8 ± 0.9 % in the focuses of involution 2.3 ± 0.4 % and about 0.6 ± 0.01 % in vascular malformations in the phase of proliferation. Positive membranous and partial cytoplasmic response of protein glucose transporter GLUT-1 were observed in all hemangiomas regardless of the phase of development and were negative in endothelial cells of malformations.

Conclusions. Pathologic picture of malformations is significantly different from that in hemangiomas. In cases when morphological diagnosis must be made, the response to protein GLUT-1 may be used as a immunohistochemical test of differences between infant hemangiomas and malformations, and in combination with Ki-67 may be used as test of differences of hemangiomas phases.

Key words: vascular anomalies, children, immunohistochemical study.